

16.08.99

PCT/NL 99 / 00442

KONINKRIJK DER



NL 99/00442
09/1743364
NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom

REC'D 24 AUG 1999

WIPO PCT



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 10 juli 1998 onder nummer 1009614,
ten name van:

EIJKMAN-WINKLER INSTITUUT

te Utrecht

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Farmaceutisch en diagnostisch gebruik van Chemotaxis Inhibiting Protein of Staphylococcus
(CHIPS)",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 16 augustus 1999.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

A. W. van der Kruk.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

100961

B	100961
1	100961

UITREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking de ontdekking van een nieuw eiwit van de bacterie *Staphylococcus aureus*, met immunomodulerende eigenschappen. De uitvinding betreft de vervaardiging van een farmaceutische samenstelling als algemene ontstekingsremmer ervoor de behandeling van AIDS en tevens het gebruik van antilichamen tegen CHIPS voor de behandeling van Staphylococceninfecties.

**Farmaceutisch en diagnostisch gebruik van Chemotaxis Inhibiting Protein of
Staphylococcus (CHIPS)**

5 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een nieuwe manier voor de
behandeling van ontstekings reacties.

Heel in het algemeen is een ontstekings reactie een proces waarbij afweercellen
zich begeven naar een haard van infectie en daar zorg dragen voor de eliminatie van de
veroorzaker. Daarbij komen verschillende mediators vrij die bijdragen aan de eliminatie
10 maar ook zorgen voor de ontstekings verschijnselen. Er kan onderscheid worden gemaakt
in acute opspelende ontstekingen (zoals sepsis) en de sluimerende chronische
ontstekingen (zoals reuma). Bij personen met een verlaagde weerstand kunnen acute
ontstekingen vaker en heftiger opspelen (zoals bij AIDS).

Een infectie met bacteriën leidt tot de vorming van chemotactische factoren die
15 ervoor zorgen dat de leukocyten naar de haard van de infectie gaan. Een chemotactische
stof is aanwezig in een gradient waarlangs de leukocyten zich gericht bewegen. De bron
van een chemotactisch agens kan de bacterie zelf zijn (een groep van kleine eiwitten met
een eindstandige formyl-groep), geactiveerde complement factoren (de anafylaxinen C3a
en C5a), leukotrienen (zoals LTB₄ en PAF) en chemokines geproduceerd door
20 verschillende celtypen zoals interleukine-8 (monocyten en endotheel cellen), RANTES
en meer. Sommige chemokines zijn alleen specifiek voor een bepaald type leukocyt
andere effectueren meerdere cellen. De receptoren voor chemokines worden
onderverdeeld in een tweetal hoofdgroepen, de CC en CXC receptoren die allen behoren
tot de serpentine, receptoren die de membraan 7 maal doorkruisen.

25 Het neutraliseren van chemokines is experimenteel al toegepast, met name het
toedienen van antilichamen tegen il-8 bleken effectvol in een aantal dierexperimentele
ontstekings modellen. Daarnaast is recentelijk aangetoond dat een aantal chemokine
receptoren (CCR5 en CXCR4 met name) een rol spelen als cofactor in de infectie van
cellen door HIV. Blokkade van deze receptoren met antilichamen of liganden remde de
30 HIV infectie bij in vitro modellen.

Naast inductie van chemotaxis, de gerichte migratie van de leukocyten, zijn een

aantal chemokines in lage concentraties ook potente activatoren of primers van andere leukocyten functies. Daarom is blokkade van de chemokines door specifieke antagonisten, gericht tegen de chemokine zelf of tegen de receptor van belang bij het intoom houden van een onstekingsreactie.

5 Het is het doel van de onderhavige uitvinding een nieuw agens te ontwikkelen met ontstekingsremmende eigenschappen ter behandeling van acute en chronische ontstekings reacties.

10 In het extracellulaire medium van groeiende *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) werd een eiwit gevonden dat in staat is om verschillende chemokine receptoren te blokkeren. Hierdoor wordt voorkomen dat chemokines de leukocyten kunnen activeren en gerichte migratie induceren. Op deze wijze is het *Staphylococcus* eiwit in staat de leukocyten activatie te verhinderen. Het actieve eiwit is gezuiverd uit het kweekmedium van de groeiende *S. aureus* wat na micro-sequentie de eerste (N-terminale) 15 aminozuren van het eiwit opleverde. Sequentie analyse in databanken leverde geen homologie met
15 enig bekend bacteriële of eukariotische sequentie op. Derhalve is dit een unieke sequentie.

Omdat dit unieke eiwit geïsoleerd uit de supernatant van de *Staphylococcus aureus* inhibitie geeft van chemotaxie werd dit eiwit 'CHIPS' genoemd: **CH**emotaxis **I**nhibitory **P**rotein from *Staphylococcus aureus*.

20 De onderhavige uitvinding betreft derhalve het gebruik van CHIPS voor de vervaardiging van een farmaceutische samenstelling dat als ontstekingsremmer kan worden gebruikt bij acute of chronische onstekingsreactie in het algemeen en bij HIV infecties in het bijzonder.

25 De superfamilie van chemotactische cytokines, chemokinen, wordt gekenmerkt door 4 geconserveerde cysteïnes. Afhankelijke van de relatieve positie van de eerste twee cysteïnes worden er twee families onderscheiden: de C-X-C of alfa-chemokines en de C-C of beta-chemokines. De CXC chemokines zijn vooral actief op granulocyten terwijl de CC chemokines een breed scala van leukocyten activeert, waaronder monocyt, eosinofielen, T-lymfocyten, NK-cellen en dendritische cellen. Deze familie van
30 chemokines en ook de klassieke chemotactische agens zoals fMLP en C5a binden en activeren een familie van rhodopsine-achtige, GTP-bindend eiwit gekoppelde zeven-

transmembraan domein receptoren (de serpentines). Naast herkenning van chemokines is voor een aantal van die receptoren beschreven dat ze een cofactor zijn bij de infectie met HIV. Voor de T-cel-trofe stammen van HIV is CXCR4 als cofactor geïdentificeerd en voor mono-trofe stammen is dat CCR5. Liganden en specifieke antilichamen remmen de infectie van cellen door HIV in vitro.

Incubatie van verschillende cellen met CHIPS resulteerde in een sterk verlaagde expressie van een aantal van de chemokine receptoren, van zowel klassieke chemotactische agens als fMLP en C5a op granulocyten, alsmede de expressie van CXCR4 en CCR5 op lymfocyten, monocyt en macrofagen. De verminderde receptor expressie was gerelateerd aan sterk verlaagde chemotaxie t.o.v. de chemokines alsmede een verminderde infectie met HIV.

Omdat van CHIPS nu alleen de eerste 15 aminozuren bekend, is het van belang het om het Gen te identificeren in het Staphylococcus DNA en vervolgens de gehele sequentie van CHIPS te kunnen afleiden.

De farmaceutische samenstellingen, die volgens de uitvinding CHIPS als actief ingrediënt bevatten zullen in het bijzonder bedoeld zijn voor parenteraal, en dan met name intraveneus gebruik. De farmaceutische samenstellingen kunnen bereid worden door het combineren (dat wil zeggen mengen, oplossen etc.) Van CHIPS met voor intraveneuze toediening geschikte, farmaceutisch acceptabel excipiënten. De concentratie van het actieve ingrediënt in een farmaceutische samenstelling kan variëren tussen 0.001% en 100%, afhankelijk van de aard van de behandeling en de wijze van toediening. De toe te dienen dosis van het actieve ingrediënt hangt eveneens af van de toedieningsroute en toepassing, maar kan bijvoorbeeld variëren tussen 0.01 en 1 mg per kg lichaamsgewicht, bij voorkeur tussen 0.1 μ g en 100 μ g per kg lichaamsgewicht.

CHIPS werd geïsoleerd uit het kweeksupernatant van Staphylococcus aureus via ligand-dye affiniteits chromatografie, gelfiltratie en concentratie stappen. De activiteit van de fracties met CHIPS werd gevolgd op het vermogen de fMLP binding aan granulocyten te verhinderen. De activiteit van CHIPS werd getest op verschillende chemokine receptoren op verschillende leukocyten. De remming van HIV infectie werd getest in T-cellen en macrofagen. Details van deze proeven worden beschreven in de hierna volgende voorbeelden, die slechts bedoeld zijn ter illustratie en niet de bedoeling

hebben de uitvinding op enigerlei wijze te beperken.

VOORBEELDEN

5 **VOORBEELD 1**

Identificatie en isolatie van CHIPS als chemotaxie remmend molecuul.

1.1a Materiaal en methode isolatie

10 Staphylococcus aureus 1690 (een klinisch isolaat, AZU) wordt overnacht gekweekt in IMDM (Gibco) en vervolgens 1:40 verdund in vers IMDM voor een 7 uurs kweek bij 37°C. Na pelleteren van de bacteriën wordt de S.aureus supernatant (SaS) verzameld, gefilterd over een 0.2 µm filter en direct verder gebruikt. Zie ook Veldkamp et al, Inflammation, vol 21, pagina's 541-551 (1997).

15 Een hoeveelheid van 2 liter SaS wordt over een drietal in tandem gekoppelde kolommen (25 ml) geleid. Deze drie kolommen zijn achtereenvolgende een 'Reactive Yellow 86' ligand-dye cross-linked 4% beaded agarose kolom (Sigma), een DNA-Cellulose (Pharmacia) en een 'Reactive Green 19' ligand-dye cross linked 4% beaded agarose kolom (Sigma). De groene (Reactive Green 19) kolom wordt na spoelen geëluëerd met 2 M NaCl en de actieve fracties worden gepoold en 10x geconcentreerd met polyethyleen glycol. Het geconcentreerde materiaal wordt op 20 een Pharmacia Superdex-200 gelfiltratie kolom gescheiden waarna de actieve fracties worden gepoold, geconcentreerd, gedialyseerd en gevriesdroogd. Het uiteindelijke gezuiverde materiaal wordt opgenomen in een klein volume buffer en o.a. gebruikt voor micro-sequentie analyse. Daartoe wordt een monster geanalyseerd op een 12.5% SDS-PAGE (Mini-Protean II; BioRad) en overgebracht 25 op Immobilon-P PVDF-membraan (Millipore) door middel van de Mini Trans-Blotter (BioRad). De eiwitten worden aangekleurd met Coomassie Blue en het eiwit rond 17 kDa wordt uitgesneden. Van dit monster wordt de N-terminaleaminozuur sequentie bepaalt.

1.1b Materiaal en methode binding van fMLP aan granulocyten.

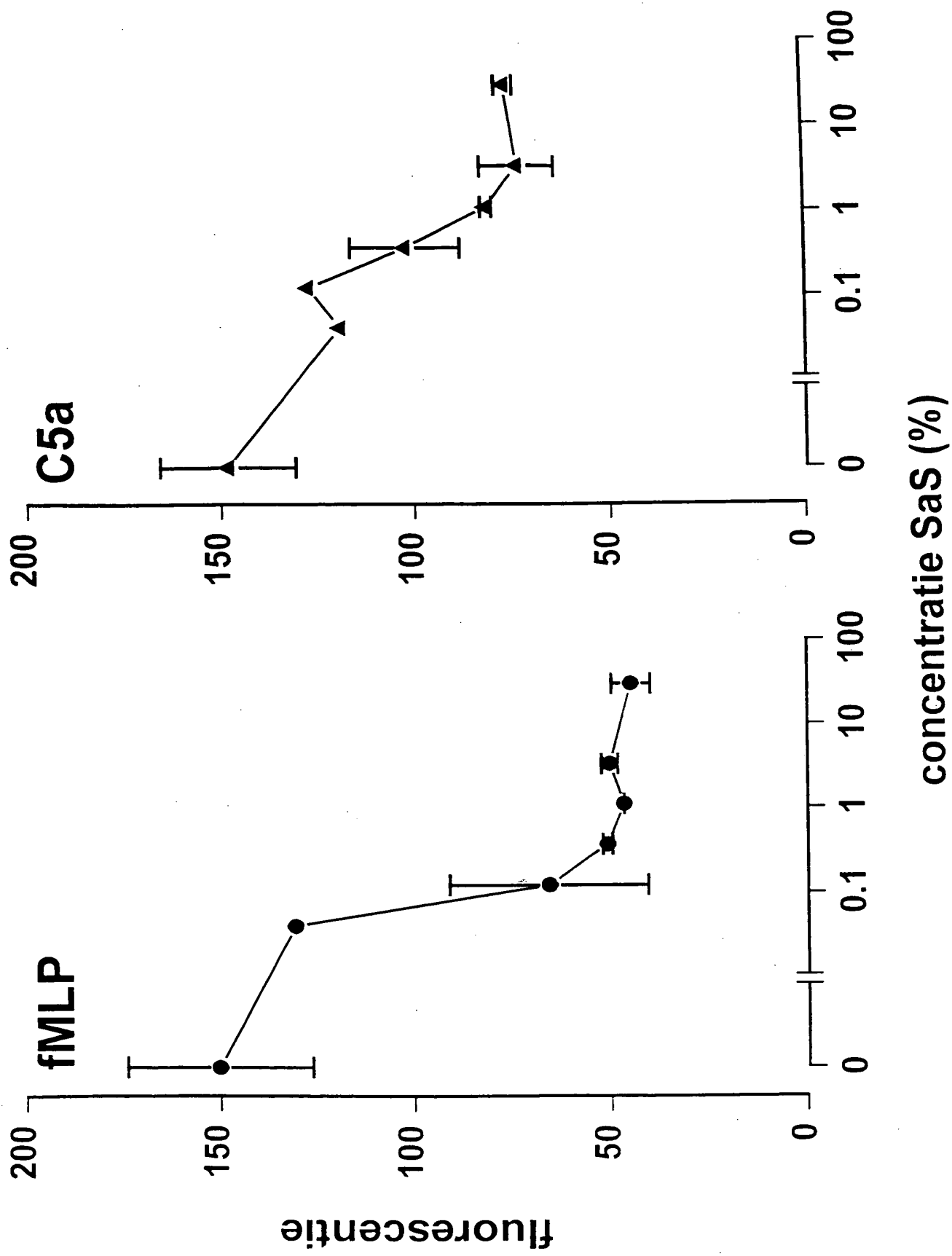
30 Granulocyten worden geïsoleerd uit Heparine bloed van gezonde vrijwilligers via een Histopaque-Ficoll gradient volgens standaard methode. De overgebleven

CONCLUSIES

1. Gebruik van Chemotaxis inhibiting protein van Staphylococcen (CHIPS) en/of fragmenten daarvan voor de vervaardiging van een farmaceutische samenstelling als algemene ontstekingsremmer.

2. Gebruik van Chemotaxis inhibiting protein van Staphylococcen (CHIPS) en/of fragmenten daarvan voor de vervaardiging van een farmaceutische samenstelling voor de behandeling van AIDS

3. Gebruik van neutraliserende antilichamen tegen Chemotaxis inhibiting protein van Staphylococcen (CHIPS) voor de vervaardiging van een farmaceutische samenstelling voor de behandeling van Staphylococcen infecties.



Figuur 1.

Figuur 2

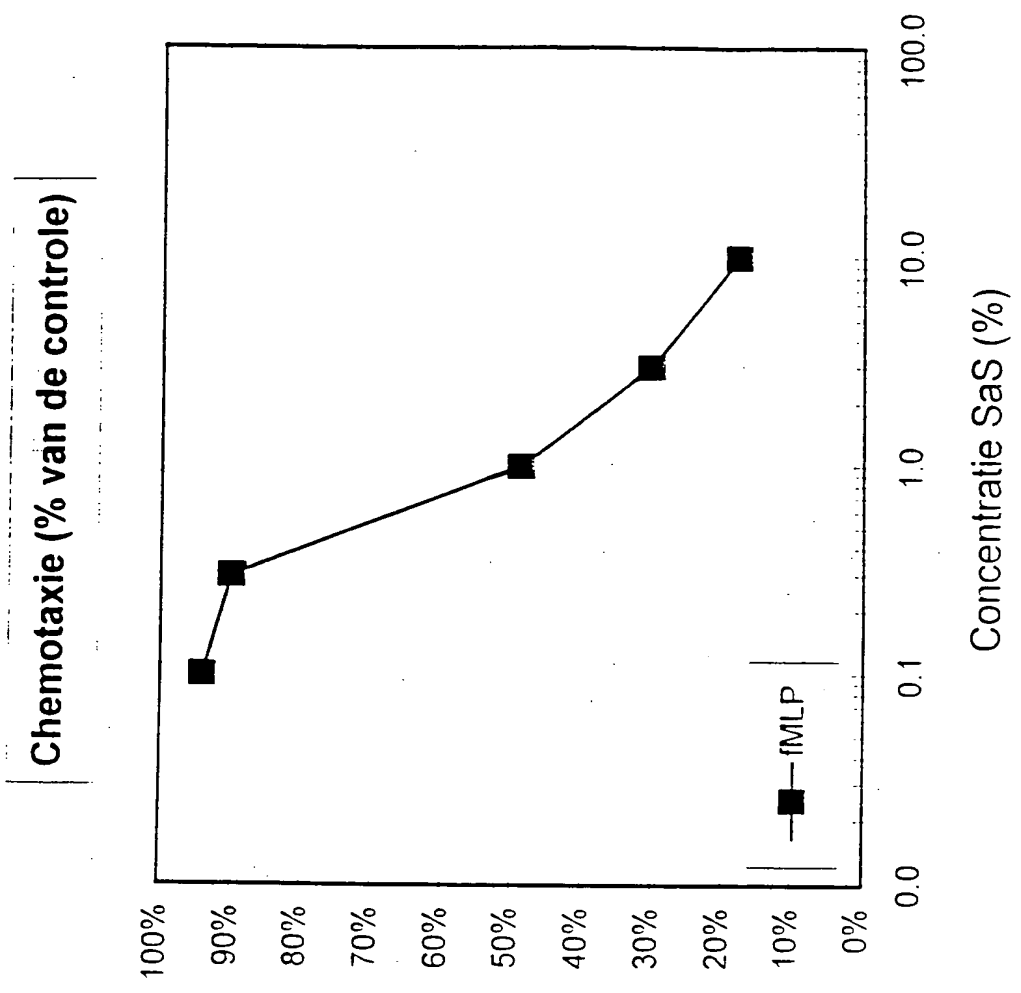
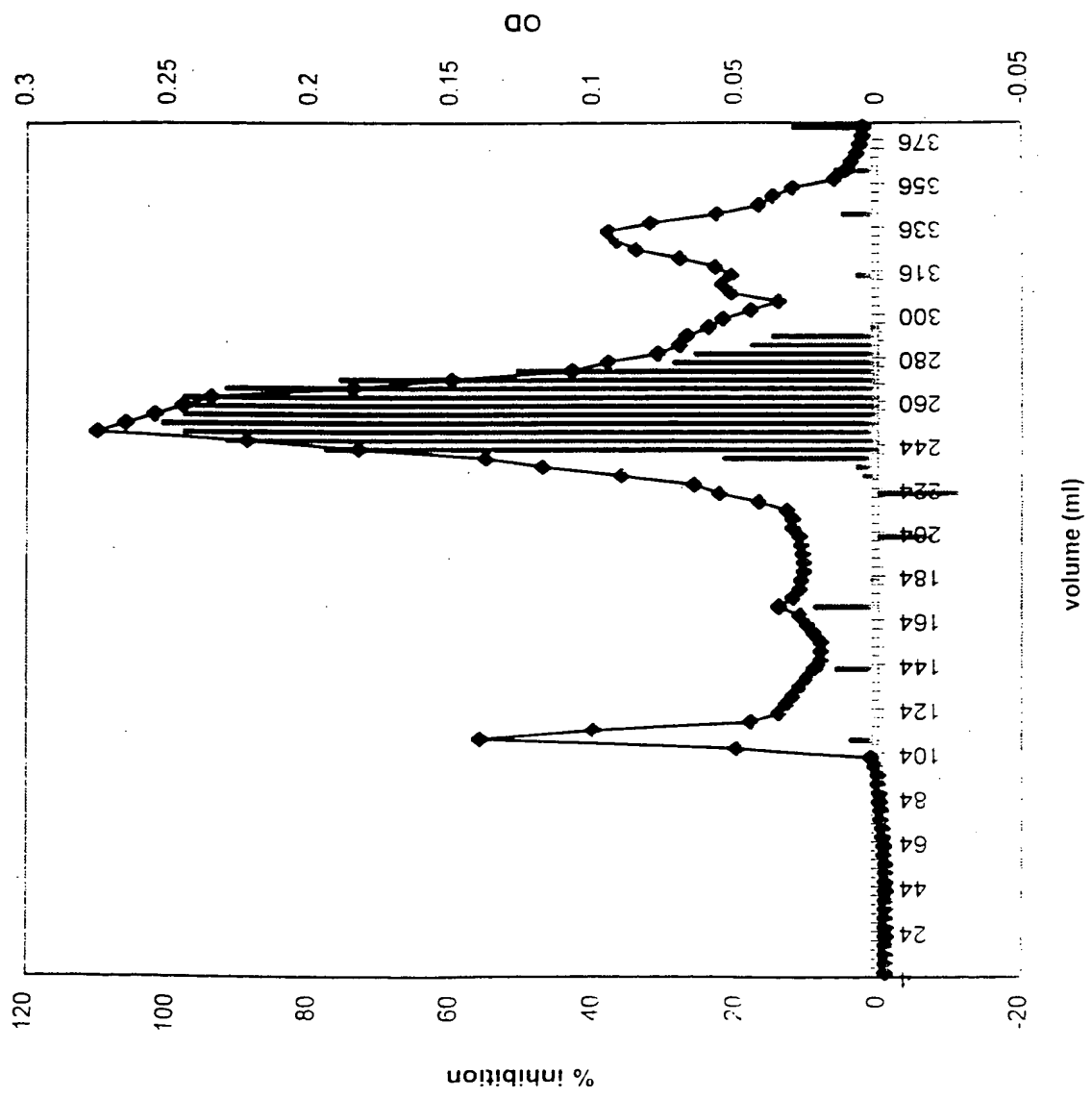


Figure 3 1009614

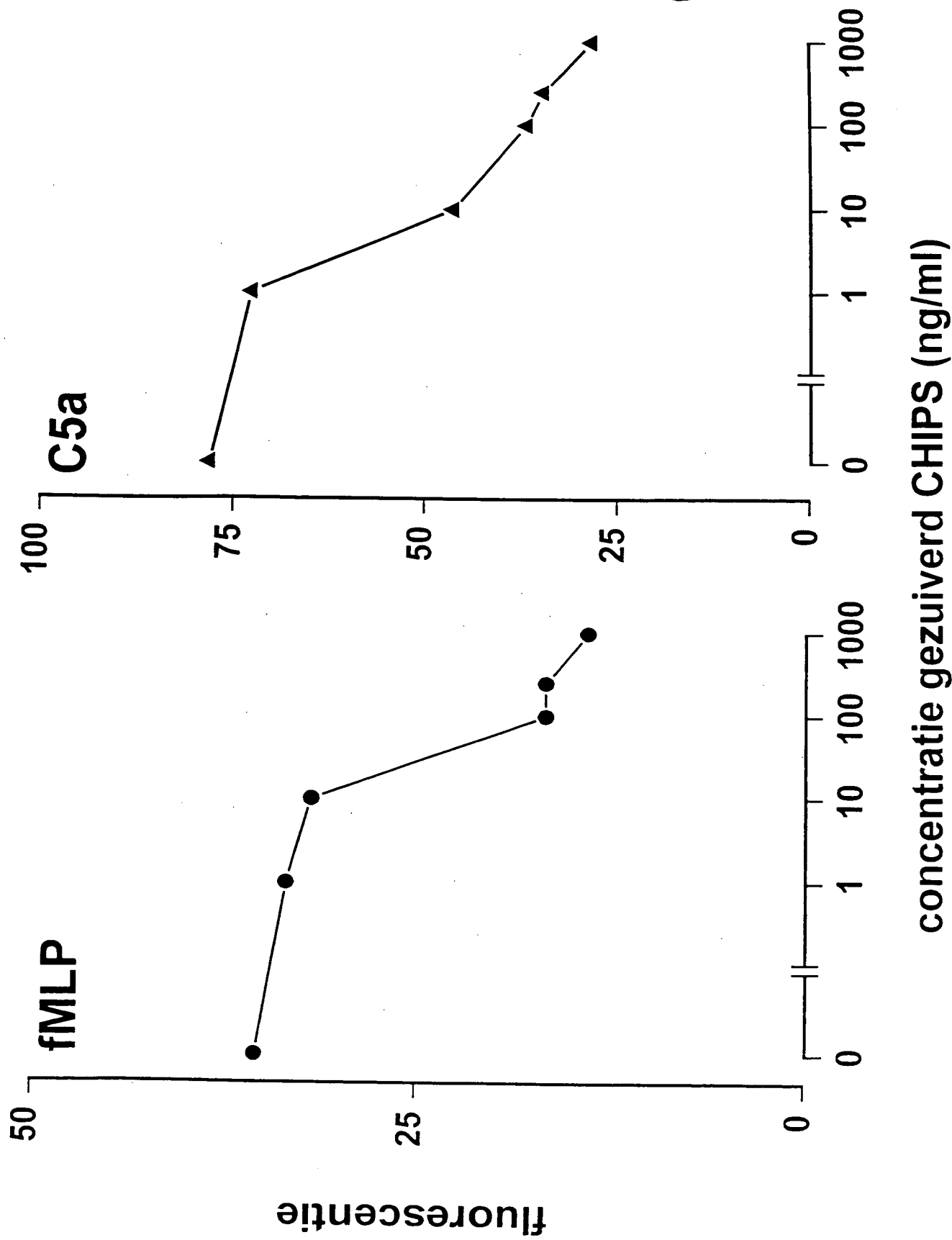


aminozuur nummer				
1*	F*	Phe*		fenylalanine*
2	T	Thr		threonine
3	F	Phe		fenylalanine
4	E	Glu		glutamaat
5	P	Pro		proline
6	F	Phe		fenylalanine
7	P	Pro		proline
8	T	Thr		threonine
9	N	Asn		asparagine
10	E	Glu		glutamaat
11	E	Glu		glutamaat
12	I	Ile		isoleucine
13	E	Glu		glutamaat
14	S	Ser		serine
15	N	Asn		asparagine

FIGUUR 4

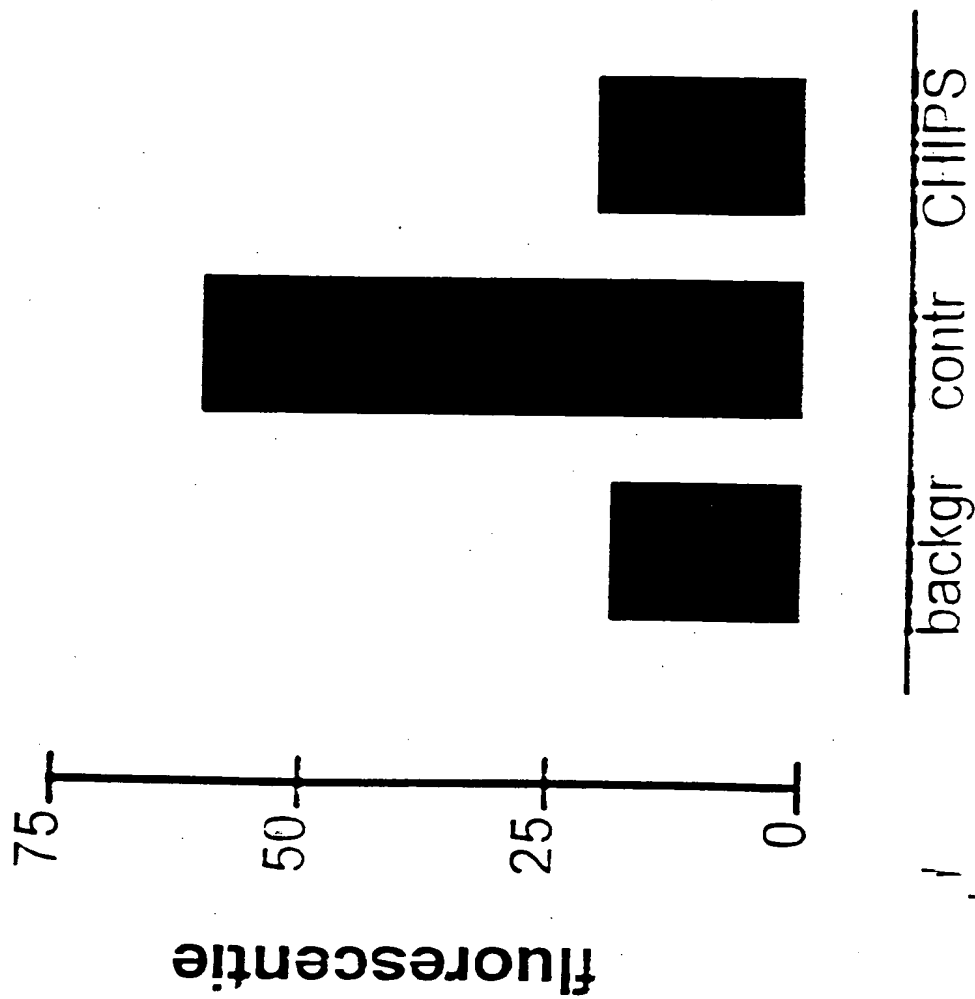
11

100961



Figuur 5.

Figure 6.



THIS PAGE BLANK (USPTO)